

学校编码: 10384

学号: 200426051

分类号_____ 密级_____

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

利用 REMI 法建立尖孢镰刀菌甜瓜
专化型的遗传转化系统

Establishment of a Transformation System for
Fusarium oxysporum f. sp. melon by REMI Method

李 柏 青

指导教师姓名: 周 涵 韬 副教授

专 业 名 称: 发育生物学

论文提交日期: 2007 年 6月15日

论文答辩时间: 2007 年 7月 9日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 田惠桥 教授

评 阅 人: _____

2007 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
1 前言.....	5
1.1 农作物枯萎病的发生与危害.....	5
1.2 甜瓜枯萎病的防治措施.....	7
1.3 丝状真菌的转化.....	8
1.4 本研究的目的和意义.....	14
2 材料与方法.....	15
2.1 材料.....	15
2.2 方法.....	17
3 结果与讨论.....	23
3.1 质粒的提取.....	23
3.1.1 质粒的保存和提取.....	23
3.1.2 讨论.....	23
3.2 尖孢镰刀菌的菌丝培养及分生孢子的获得.....	24
3.2.1 尖孢镰刀菌的菌丝培养.....	24
3.2.2 尖孢镰刀菌分生孢子的获得.....	24
3.2.3 讨论.....	24
3.3 REMI 法介导尖孢镰刀菌的遗传转化.....	25
3.3.1 尖孢镰刀菌分生孢子的再培养.....	25
3.3.2 原生质体的制备.....	25
3.3.3 原生质体的转化与再生.....	27
3.3.4 转化子的筛选.....	28
3.3.5 讨论.....	28
3.4 转化子的抗性鉴定.....	30

3.4.1 原始尖孢镰刀菌对潮霉素的敏感性鉴定.....	30
3.4.2 转化子的潮霉素抗性鉴定.....	30
3.4.3 转化子的遗传稳定性鉴定.....	30
3.4.4 讨论.....	31
3.5 转化子的 PCR 鉴定.....	31
3.5.1 CTAB 法提取基因组 DNA 结果.....	31
3.5.2 原始尖孢镰刀菌与转化子的 18S rDNA 比较与鉴定.....	32
3.5.3 原始尖孢镰刀菌与转化子的潮霉素抗性基因 PCR 比较与鉴定.....	32
3.5.4 讨论.....	37
3.6 转化子的微生物学特性鉴定.....	37
3.6.1 产孢量的测定.....	37
3.6.2 生长速度的测定.....	38
3.6.3 讨论.....	39
3.7 转化子的致病性鉴定.....	40
3.7.1 回接甜瓜盆栽苗观察发病情况分析.....	40
3.7.2 讨论.....	41
4 总结与展望.....	43
5 参考文献.....	46
致谢.....	51

Catalogue

Abstract in Chinese.	1
Abstract in English.	3
1 Introduction.	5
1. 1 Occurrence and harm of wilt disease in agricultural crops.	5
1. 2 Preventive measures of the wilt disease in melon.	7
1. 3 Transformation system of filamentous fungi.	8
1. 4 Purpose and significance of this thesis.	14
2 Materials and methods.	15
2. 1 Materials.	15
2. 2 Methods.	17
3 Results and discussion.	23
3. 1 Plasmid extraction.	23
3. 1. 1 Plasmid conservation and extraction.	23
3. 1. 2 Discussion.	23
3. 2 Mycelium culture and conidiophore collection of <i>Fusarium oxysporum</i> .	24
3. 2. 1 Mycelium culture of <i>Fusarium oxysporum</i> .	24
3. 2. 2 Conidiophore collection of <i>Fusarium oxysporum</i> .	24
3. 2. 3 Discussion.	24
3. 3 Restriction enzyme mediated <i>Fusarium oxysporum</i> transformation.	25
3. 3. 1 Conidiophore reculture of <i>Fusarium oxysporum</i> .	25
3. 3. 2 Preparation of protoplast.	25
3. 3. 3 Transfomation and regenesis of protoplast.	27
3. 3. 4 Selection of transformants.	28
3. 3. 5 Discussion.	28
3. 4 Resistance identification of transformants.	30

3. 4. 1	The hygromycin resistance of original <i>Fusarium oxysporum</i>	30
3. 4. 2	The hygromycin resistance of transformants.	30
3. 4. 3	Inheritance stabilization of transformants.	30
3. 4. 4	Discussion.	31
3. 5	The PCR identification of transformants.	31
3. 5. 1	Extraction of genome DNA by CTAB method.	31
3. 5. 2	18S rDNA comparison and identification of original <i>Fusarium oxysporum</i> and transformants.	32
3. 5. 3	The hygromycin resistance gene comparison and identification of original <i>Fusarium oxysporum</i> and transformants.	32
3. 5. 4	Discussion.	37
3. 6	Characteristic dentification of transformants in microbiology.	37
3. 6. 1	Mensuration of spores number.	37
3. 6. 2	Mensuration of growth speed.	38
3. 6. 3	Discussion.	39
3. 7	Identification of virulence of transformants.	40
3. 7. 1	Analysis of pathogenesis of the inoculated melons.	40
3. 7. 2	Discussion.	41
4	Conclusion and Expectation.	43
5	Reference.	46
	Acknowledgements.	51

摘要

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是一种世界性分布的重要植物病原真菌,寄主范围广泛,可引起100多种植物的维管束萎蔫病害。构建表达载体质粒,进行尖孢镰刀菌的遗传转化,对所转化的尖孢镰刀菌进行生物化学与分子生物学检测,这对于了解尖孢镰刀菌的致病机理具有重要意义,为进行进一步的生防研究奠定基础。限制酶介导整合转化(restriction enzyme-mediated integration, REMI)的方法由于其操作简单,转化效率高,单拷贝整合多,正被越来越多地应用于丝状真菌的遗传转化。

本研究较系统地对尖孢镰刀菌的REMI转化体系进行了摸索和优化,并对部分转化子的表型进行了初步的分析,建立起了一套完整、有效的尖孢镰刀菌遗传转化体系,主要结果如下:

1、掌握尖孢镰刀菌菌丝的培养条件,分生孢子的获得及转化前分生孢子的再培养。为了获得幼嫩的菌丝,分生孢子进行再培养时以50mL的PD培养基中加入 10^7 个左右的孢子为宜,培养温度和摇床转速分别为28℃和80r/min,培养时间为10~12h。

2、尖孢镰刀菌原生质体的制备是整个转化中最关键的一步,酶解得到的原生质体的数量和质量直接影响到转化的效果。通过实验发现,把溶壁酶配置成2%的浓度,酶解尖孢镰刀菌菌丝的细胞壁时以32℃的温度,摇床轻轻晃动3h左右可获得大量的高质量原生质体。

3、分别提取原始尖孢镰刀菌和转化子的基因组DNA,经过18S rDNA基因序列测定,证明了转化前后的菌株为尖孢镰刀菌。设计特定的引物扩增潮霉素基因片段,原始的尖孢镰刀菌无潮霉素基因片段,而三个转化子均扩出了潮霉素基因片段。

4、转化子表型分析发现,同样的培养条件下三个转化子及原始尖孢镰刀菌的产孢量分别为 1.19×10^4 个/mL、 0.48×10^4 个/mL、 0.59×10^4 个/mL、 2.63×10^4 个/mL,三个转化子的产孢量比原始尖孢镰刀菌少,但生长速度确比原始尖孢镰刀菌快。

5、三个转化子及原始尖孢镰刀菌分别回接甜瓜盆栽苗,10d后回接的甜瓜盆栽苗均发病,其中转化子L128-T1回接的盆栽苗每株中只有少数叶片开始变黄,

发病速度慢，而清水处理的盆栽苗无发病现象。

关键词：尖孢镰刀菌；枯萎病；甜瓜；REMI

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Fusarium xysporum is one of the most important plant pathogenic fungi spread all over the world and its hosts are extensive. It can cause over 100 kinds of plants vascular bundle to wither. It is important for us to find the pathogenic mechanism by constructing the express plasmid vector, processing the transformation of *Fusarium xysporum*, carrying the biochemical and molecular survey of the transformants. Restriction enzyme-mediated integration(REMI), which has high transform frequency and more conformed single copy, is applied in signing and cloning genes about nosogenesis of mycelial fungi more and more.

This study manages to explore and optimize the transformation system, analyze the phenotypes of several transformants as well as establish a set of integrated and effective *Fusarium xysporum* transformation system. Main results are followed:

1. Master the culture condition of mycelium of *Fusarium xysporum*, ways of collecting conidiophores and the reculture of spores before the transformation. In order to get the tender mycelium, the optimums are, concentration of conidiophores 10^7 per 50ml PD culture medium, culture temperature 28°C, rotate speed of the shaker 80r/min, culture time 10~12h.

2. The preparation of *Fusarium* protoplast is the key step during the transformation. The quantity and quality of the protoplast digested by enzyme will directly influence the effect of transformation. Through the experiment we find that larger numbers of high-quality protoplasts can be acquired by controlling the lywallzyme concentration in 2%, digest temperature in 32°C then shaking softly for 3 hours.

3. Extract the genome of the original *Fusarium xysporum* and the transformants, by sequencing the 18S rDNA, it is proved that the transformants still belong to *Fusarium xysporum*. Certain primers were designed to amplify hygromycin gene. The hygromycin-resistance of primal *Fusarium xysporum* is negative while the transformants is positive.

4. The analysis of the phenotypes of the transformants suggests that under the

same condition the spores number of three transformants and the primal *Fusariumo xysporum* are 1.19×10^4 /mL、 0.48×10^4 /mL、 0.59×10^4 /mL、 2.63×10^4 /mL. Although the spores number of three transformants is less than the primal *Fusariumo xysporum*, the growth speed is much faster.

5. Three transformants and the primal *Fusariumo xysporum* were inoculated to the sweet melon, after 10 days, all sweet melon took on morbidity. The speed of sweet melon inoculated by L128-T1 was slower than that of others. And the spotted seedling dealed with water had no symptom.

Key words: *Fusariumo xysporum*;wilt disease;sweet melon;REMI

1 前言

1.1 农作物枯萎病的发生与危害

1.1.1 枯萎病原

枯萎病是一类植物病害的总称,因病原菌的侵害,造成植物枯死萎蔫。枯萎病有细菌性病原(如香蕉细菌性枯萎病等)和真菌性病原两种。本文所指的枯萎病为真菌性病原,是由镰刀菌属真菌寄生引起的一种世界性的真菌土传病害,其中尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl.)是主要病菌种类之一。尖孢镰刀菌属半知菌类(*Fungi imperfecti*)、梗孢目(*Moniliales*)、痾孢科(*Tubercular*)、镰刀菌属(*Fusarium*)。自从Snyder和Hansen(1940)把镰刀菌属美丽组内的种合并为1个,成为尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)^[1]。

1.1.2 寄主范围

(1) 经济作物:棉花、油桐、蓖麻、亚麻等。(2) 茄科作物:番茄、胡椒、茄子、烟草、马铃薯等。(3) 瓜类作物:黄瓜、节瓜、冬瓜、西瓜、南瓜、西葫芦、甜瓜、丝瓜、白瓜、越瓜、苦瓜、葫芦瓜、哈密瓜等。(4) 豆科作物:大豆、四季豆、豇豆、猪屎豆、豌豆等。(5) 花卉植物:康乃馨、郁金香、鱼尾菊、非洲菊、鸢尾、水仙、翠菊、合欢、百合、仙人掌、穿心莲、一品红、草坪草等。(6) 林果植物:松树、相思树、柑桔、沙棘、水杉、铁线莲属植物、梨树等。(7) 其它植物:莴苣、小麦、大蒜、荸荠、芦笋、姜、香蕉等^[1]。

1.1.3 危害症状

植株被尖孢镰刀菌侵染后,发病症状多种多样,一般导致维管束枯萎、植株枯黄、球茎和根腐烂,植株生长衰弱。植株发病后,最初的症状表现嫩叶上出现轻微的褪绿,而后老叶开始下垂。苗期植株发病后迅速死亡;成株期产生叶脉失绿和叶片下垂,植株生长缓慢、下部叶片黄化、不定根形成、叶片和嫩茎萎蔫、落叶、剩余叶片边缘坏死,最终导致全株死亡。维管束组织的褐变是尖孢镰刀菌引起的枯萎病最明显的特征,在较老的植株上,从盛花期到果实成熟期,症状会变得更明显^{[2] [3]},如图1.1所示。



图1.1 农作物枯萎病

A 西瓜枯萎病；B 黄瓜枯萎病

Fig.1.1 Fusarium wilt disease in agricultural Crops

1.1.4 侵染方式

尖孢镰刀菌在土壤中营兼性寄生，它的腐生能力使得它可在土壤中长期生存，在植株残株上也可以生存。这些真菌以菌丝体或3种孢子(小型分生孢子、大型分生孢子、厚垣孢子)中的任何一种存活^[4]。尖孢镰刀菌的孢子萌发或菌丝体的侵入部位为植物根部，可直接从根颈、根部伤口或是在侧根生长点进入植株体。一旦进入植株体内，菌丝体就在根皮层细胞间生长，当菌丝体到达木质部后，通过木质部的纹孔侵入导管，而后在导管中向上生长，至植株的茎和顶部。病原菌丝体生长过程会产生分枝、生成小型分生孢子，小型分生孢子顺着导管从下往上移动，当小型分生孢子萌发时，菌丝体会穿透木质部上层壁，在相邻的导管中产生更多的小型分生孢子。同时，尖孢镰刀菌也会通过木质部的纹孔横向进行进一步扩展。由于病原菌在植株维管组织内的生长，植株的营养和水分供应受到了很大的影响，导致叶片气孔的关闭、萎蔫和植株的整体死亡^[5]。这时，病原菌侵入植株的软组织，直至最终到达死亡组织的表面，在那里大量地产生孢子，这些孢子又成为病原菌进一步扩散的接种体^[6]。

1.1.5 传播途径

枯萎病原以菌丝体、分生孢子、厚垣孢子在土壤及未腐熟的带菌绿肥中越冬，种子也可带菌。尖孢镰刀菌的短距离传播主要是通过灌溉水和带菌的农用具。长距离传播是通过带菌的种苗和土壤，也可以通过风进行孢子传播。尽管病原菌

有时也会侵染果实和种子，但通过种子传播的可能性很小^[7]。

1.1.6 病害流行

在我国南方，作物枯萎病中以瓜类枯萎病发生最为严重；在我国北方，以棉花枯萎病发生最为严重。枯萎病在植株的全生育期均可以生，一旦发病，就难以根除，随着连作年份的增加，发病率越发严重^[8]。20世纪90年代以来，我国设施蔬菜瓜类作物面积不断增加；由于在相对封闭的设施内形成的特殊小气候有利于蔬菜生长，也可为各种病虫害滋生的温床，加之长年连作，使土壤中病原菌的数量不断增加，设施栽培蔬菜的枯萎病发生越来越重。作物枯萎病一般导致减产20~30%，严重田块可达50~80%，甚至绝产，已成为限制着我国作物生产发展重要因素^[9]。

1.2 甜瓜枯萎病的防治措施

甜瓜枯萎病发病高峰期在植株开花至坐果期。发病初期，植株叶片从基部向顶端逐渐萎蔫，中午尤其明显，早晚尚可恢复，数日后植株全部叶片萎蔫下垂，不再恢复。茎蔓基部稍缢缩，表皮粗糙，常有纵裂。病部在潮湿时，根茎部呈水渍状腐烂，表面常产生白色或粉红色霉状物。有的病株根褐色，易拔起，皮层与木质部易剥离，其维管束变褐色。苗期至成熟期都可发病，苗期造成子叶或全株萎蔫茎基部变褐缢缩，呈猝倒状。其防治措施有：

- ① 选用抗病品种。一般薄皮甜瓜比厚皮甜瓜抗病。
- ② 与非瓜类作物实行五年以上轮作，最好是水旱轮作。
- ③ 播种前种子消毒。(1) 浸种，用70%甲基托布津500倍液或50%多菌灵可湿性粉剂1000倍液浸种40分钟，捞出后用水冲洗干净，催芽，播种。(2) 拌种，刚种播种时，将种子用水浸后捞出，以种子重量的0.2%~0.3%的50%多菌灵粉剂拌种，然后再播种。
- ④ 嫁接育苗。用南瓜、瓠瓜作砧木进行嫁接栽培。
- ⑤ 加强栽培管理，增强植株抗病性。
- ⑥ 药剂防治。重病田可穴使药土，药土的比例为1:100，在穴内下铺、上盖，然后覆土。可选择的药剂有70%甲基托布津、50%多菌灵等。田间发病初期

可选用 25%溶菌灵可湿性粉剂,或 50%多菌灵可湿性粉剂 500~800 倍液在植株根部浇灌,每株灌药液 250 毫升,每 5~7 天 1 次,连灌 3 次。用“绿享一号”、“绿享二号”、“绿享五号”进行土壤处理苗床,每平方米 1 克对枯萎病防治效果较好^{[10] [11]}。

1.3 丝状真菌的转化

1.3.1 研究概况

丝状真菌作为低等的真核生物,对人类生命活动的各个方面均产生了深远的影响,为了控制真菌对人类不利的一面,充分利用其有益的特性服务于人类,就必须深入的了解其生理、遗传以及分子生物学方面的信息,并通过分子生物学手段对其进行有效改造^[12]。真菌是一类具有独特的形态学、生理学特征的真核生物,诸如生长形态丝状或酵母状;具有坚硬的几丁质细胞壁;具顶端生长特性;营腐生或寄生生活;孢子繁殖;基因组相对较小;多余DNA含量少等特点。由于丝状真菌能将现代分子生物学技术与经典的遗传学技术很好的结合在一起,使得丝状真菌成为进行分子遗传学理论研究极好的模式生物^[13]。

分子遗传学研究的一个关键因素在于遗传转化系统的研究和发展。遗传转化技术的发展对于人们进一步分离基因和分析基因的功能提供了强有力的工具,目前遗传转化技术已经广泛的应用于原核生物和真核生物。自1973年Tatum和Mishra首次报道粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)的转化以来,丝状真菌遗传转化系统研究发展非常迅速,尤其是近几年来相关的文献报道剧增^[14]。

1.3.2 选择标记和转化载体

通常真菌转化通过营养缺陷互补,表型互补或显性标记选择转化子。一般真菌基因启动子有较广泛的宿主范围,因此以一个已鉴定的某种丝状真菌的营养缺陷型突变体为受体,不但可克隆到野生型的同源基因,还可能克隆到野生型的异源基因。但分离特异的营养缺陷型,尤其从具有工业意义的丝状真菌中分离比较困难,因此很快发展了多种抗生素抗性标记并且应用于很多的病原菌转化中。目前在丝状真菌转化中常用的一些抗性选择标记包括:

潮霉素B抗性(Hygromycin B resistance) 潮霉素B是一种氨基糖普类抗生素。

它可以通过抑制蛋白质的合成阻碍原核生物、真核生物和哺乳动物细胞的生长。尽管一些真菌种类需要较高的潮霉素B的浓度来抑制其生长，但在浓度50~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内可以抑制大多数真菌的生长。从大肠杆菌中获得的潮霉素抗性基因(*hph*)已经被广泛地应用在真菌的DNA转化中。其最常用的载体是pAN7-1、pCB1004、pCB1535等^[15]。

腐草霉素抗性(Phleomycin resistance) 腐草霉素抑制DNA的合成。腐草霉素和放线菌素一样在其与DNA结合时，似乎具有自己的选择特异性。它似乎对富含A-T碱基对的多核苷酸具有亲和力，并且在不妨碍RNA聚合酶活性的浓度下抑制DNA聚合酶活性。尽管腐草霉素在浓度为100~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内可以抑制大多数真菌的生长，但是对于一些种类的真菌则需要更高的浓度去抑制。最普通的腐草霉素的抗性载体是pAN8-1^[16]。

除草剂抗性(Bialophos resistance) Bialophos是一种除草剂的活性成分，是由*Streptomyces hygroscopicus*自然产生的三肽物质。它经过分解后形成麟丝菌素——一种可以抑制谷氨酰胺合成的物质。一种编码麟丝菌素乙酰转移酶的基因从*S. hygroscopicus*的分离出来，并且作为一种选择标记被广泛地应用在高等植物和一些真菌(例如:*Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Cochhobolus sativa*和*Colletotrichum*的几个小种)的转化中(Pall *et al.*, 1994; Avalos *et al.*, 1989)。许多载体含有这种抗性基因，其中包括pCB1534和pBARGEM系列^[17]。

磺酞脉抗性(Sulfonylurea resistance) *Magnaporthe grisea* ILV1的磺酞脉抗性等位基因已经被克隆。这个基因编码乙酰乳酸合成酶。乙酰乳酸合成酶参与异亮氨酸和缬氨酸的合成。磺酞脉在浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制乙酰乳酸的合成。现今，pCB1536是应用最广的产生真菌磺酞脉抗性的载体^[18]。

苯菌灵抗性(Benomyl resistance) Benomyl是一种杀菌剂，它可以结合 β -微管蛋白引起微管的分解。这种物质可以在浓度1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内抑制很多子囊菌纲和担子菌纲的真菌。粗糙脉孢菌中的 β -微管蛋白基因的表达可以对Benomyl产生抗性^[19]。

乙酰胺酶(Acetamidase AmdS) 乙酰胺酶基因并不是一个抗生素抗性标记，它编码乙酰胺酶。乙酰胺酶可以使生物在以乙酰胺为唯一碳源的条件下生存^[20]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库